



**Instituto Politécnico de Coimbra**

**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de  
Coimbra**

**Departamento de Ciências Biomédicas  
Laboratoriais**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

Mutação MYD88 L265P no diagnóstico diferencial entre Linfoma Linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldenstrom vs Linfoma Esplénico da Zona Marginal- Estudo retrospectivo.

**Susana Almeida Santos**

**Coimbra**

**2017**

**Instituto Politécnico de Coimbra**



**Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra**

**Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais**



**Instituto Politécnico  
de Coimbra**

**Mutação MYD88 L265P no diagnóstico diferencial entre Linfoma Linfoplasmacítico/Macroglobulinemia de Waldenstrom vs Linfoma Esplénico da Zona Marginal- Estudo retrospectivo.**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Especialização de Hematologia e Imunologia Clínico-Laboratorial, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Leticia Ribeiro e coorientação da Mestre Margarida Coucelo.

## **Agradecimentos**

Á Doutora Letícia Ribeiro pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Serviço de Hematologia Clínica – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, Agradeço pela orientação e dedicação na correção deste trabalho, bem como pelas valiosas sugestões dadas.

Á Dra. Margarida Coucelo, co-orientadora deste trabalho, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Agradeço pela sua enorme disponibilidade e em especial pela sua amizade e optimismo fraterno.

Ao Doutor Artur Paiva, pela oportunidade de desenvolver este trabalho na UGOC – Unidade de Citometria de Fluxo do Serviço de Patologia Clínica. Agradeço também pela sua disponibilidade e orientação, assim com pelo seu forte incentivo e apoio.

Á Dra. Manuela Fortuna por todos os ensinamentos de Citometria de Fluxo, por todo o apoio, incentivo e grande amizade de longa data.

Á Dra Ana Teresa Simões pelo incentivo, apoio técnico e informático e amizade.

A todas as colegas do Serviço de Hematologia e da UGOC, que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, por toda a ajuda e amizade.

Á minha família, em especial ao meu marido e filho, pela paciência, apoio incondicional e carinho com que me brindaram durante este tempo.

**Júri**

Presidente: Doutor Fernando José Figueiredo Agostinho D'Abreu Mendes,  
Professor Adjunto da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Arguente: Doutora Emília Nobre Barata Roxo Cortesão,  
Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Orientadora: Doutora Maria Letícia Ribeiro,  
Professora Adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

## Resumo

**Introdução:** A Macroglobulinemia de Waldenström (MW) é um síndrome linfoproliferativo de células B raro, caracterizado pela acumulação descontrolada de Imunoglobulinas do tipo M (IgM), que são secretadas pelas células linfoplasmocíticas. Recentemente foi identificada uma mutação somática (L265P) no gene de diferenciação mielóide de resposta primária 88 (*MYD88*) em 80-100% das MW e em 50-80% das Gamopatias Monoclonais de Significado Indeterminado do tipo IgM (GMSI IgM). 3-9% dos Linfomas de Zona Marginal (LZM), o Mieloma Múltiplo (MM) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) também podem apresentar esta mutação, embora numa frequência muito baixa.

**Objetivo:** Determinar a prevalência da mutação *MYD88 L265P*, num grupo de doentes com suspeita diagnóstica de MW e estabelecer a sua correlação com as características clínicas e laboratoriais, nomeadamente; idade, sexo, valor de hemoglobina, linfócitos, plaquetas, níveis de IgM e com o imunofenótipo dos linfócitos B.

**Material e métodos:** Foram incluídos 23 doentes, 15 MW, 2 GMSI IgM, 4 LZM e 2 Linfomas Linfoplasmocíticos. A pesquisa da mutação *MYD88 L265P* foi efectuada por ASO-PCR em DNA de medula óssea ou sangue periférico. O estudo imunofenotípico da medula óssea e/ou sangue periférico foi efectuado por citometria de fluxo (BD FACSCanto™) utilizando o painel diagnóstico do consorcio *Euroflow*.

**Resultados:** Dos 23 doentes estudados, em 15 (65,2%) foi identificada a mutação *MYD88 L265P*: 13/15 (86,7%) MW, 1/2 GMSI IgM e 1/4 LZM. Nos 2 LLP não foi detectada a mutação *MYD88 L265P*. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para as características clínico-laboratoriais estudadas entre os doentes com e sem mutação *MYD88 L265P*. Por citometria de fluxo não se encontraram diferenças na intensidade média de fluorescência dos anticorpos que integram o painel *Euroflow* tendo em conta a presença/ausência de mutação *MYD88 L265P*. No entanto o grupo de doentes com *MYD88 L265P* apresenta MIF tendencialmente aumentada para o CD38 e CD79b com diminuição de expressão de CD19, CD20, CD22, CD305 e CD11c em relação aos doentes *MYD88 WT*.

**Discussão:** A mutação *MYD88 L265P* foi mais prevalente nos doentes com MW (86,7%) numa percentagem semelhante à descrita na literatura. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para características clínico-laboratoriais bem como no imunofenótipo por citometria de fluxo. Em conclusão, estes dados mostram que a identificação da mutação *MYD88 L265P* poderá ser útil como marcador diferencial entre as patologias que cursam com um componente IgM.

## Palavras-chave

*MYD88 L265P*, Macroglobulinemia, Waldenström, Linfoma de Zona Marginal.

## Abstract

**Introduction:** Waldenstrom macroglobulinemia (WM) is a rare B-cell lymphoproliferative syndrome, characterized by the uncontrolled accumulation of immunoglobulins type M (IgM), which are secreted by lymphoplasmacytic cells. A somatic mutation (L265P) has been recently identified in the primary response myeloid differentiation gene 88 (*MYD88*) in 80-100% of the WM and 50-80% of Monoclonal IgM Gammopathies of Undetermined Significance (MGUS IgM). 3-9% of Marginal Zone Lymphomas (LZM), Multiple Myeloma (MM) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) also have this mutation, although at a very low frequency.

**Objective:** To determine the prevalence of the *MYD88* L265P mutation in a group of patients with suspected WM and establish their correlation with clinical and laboratory characteristics, including; age, sex, hemoglobin value, lymphocytes, platelets, IgM levels and immunophenotype of B lymphocytes.

**Methods:** We included 23 patients, 15 WM, 2 MGUS IgM, 4 LZM and 2 LLP. The search for the *MYD88* L265P mutation was carried out by ASO-PCR in bone marrow or peripheral blood DNA. The immunophenotypic study of bone marrow and / or peripheral blood was performed by flow cytometry (BD FACSCanto™) using the diagnostic panel of the Euroflow consortium.

**Results:** Of the 23 patients studied, the L265P *MYD88* mutation was identified in 15 (65.2%): 13/15 (86.7%) MW, 1/2 MGUS IgM and 1/4 LZM. In 2 LLP, the L265P *MYD88* mutation was not detected. There were no statistically significant differences in the clinical and laboratory characteristics studied among patients with and without the L265P *MYD88* mutation. For flow cytometry, no differences were found in mean fluorescence intensity of antibodies that comprise the panel, Euroflow taking into account the presence / absence of *MYD88* L265P mutation. However we found a tendency for increased MIFexpression of CD38 and CD79b and decreased of CD19, CD20, CD22, CD305 and CD11c, in *MYD88* L265P group.

**Discussion:** The *MYD88* L265P mutation was more prevalent in patients with WM (86.7%), in a proportion similar to that described in the literature. There were no statistically significant differences in clinical and laboratory characteristics and in the immunophenotype by flow cytometry. In conclusion, these data show that the identification of the *MYD88* L265P mutation may be a useful differential marker between pathologies which occur with an IgM component.

## Keywords

MYD88 L265P, Macroglobulinemia, Waldenstrom, Marginal Zone Lymphoma.

## ÍNDICE

<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>viii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>x</b>
 <b>1. Introdução.....</b>	 <b>1</b>
1.1 Linfoma Linfoplasmocítico .....	1
1.2 Linfoma Linfoplasmocítico/ Macroglobulinemia de Waldenström <i>versus</i> Linfoma de Zona Marginal .....	2
1.3 Macroglobulinemia de Waldenström.....	3
1.3.1 Características Clínico Patológicas.....	3
1.4 Abordagem diagnóstica da Macroglobulinemia de Waldenström .....	7
1.4.1 Achados Laboratoriais .....	7
1.4.2 Imunofenótipo da Macroglobulinemia de Waldenström .....	8
1.4.3 Alterações citogenéticas e moleculares.....	10
1.5 Descoberta da mutação <i>MYD88</i> L265P .....	10
1.6 A Proteína <i>MYD88</i> .....	11
1.7 A mutação <i>MYD88</i> L265P .....	13
1.7.1 Mutação <i>MYD88</i> L265P como marcador diagnóstico no LLP/MW .....	14
1.7.2 A mutação <i>MYD88</i> L265P e novos alvos terapêuticos .....	15
<b>2. Objectivos .....</b>	<b>17</b>
<b>3. Material e Métodos .....</b>	<b>18</b>
3.1 População Estudada .....	18
3.2 Amostras .....	18
3.3 Estudos Moleculares .....	18

3.3.1 Extração de DNA .....	18
3.3.2 Pesquisa da mutação <i>MYD88</i> L265P por reacção em cadeia de polimerase (PCR) alelo-específico (ASO-PCR).....	19
3.3.3 Electroforese em gel de agarose .....	20
3.4 Imunofenotipagem .....	21
3.5 Análise Estatística .....	21
4. Resultados .....	22
4.1 Pesquisa da mutação <i>MYD88</i> L265P .....	23
4.2 Correlação entre a mutação <i>MYD88</i> L265Pe as características clinico patológicas .....	24
4.3 Imunofenótipo e presença de mutação <i>MYD88</i> L265P.....	27
<b>5. Discussão .....</b>	<b>31</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>36</b>
<b>7. Bibliografia .....</b>	<b>37</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Sinalização celular da via TLR e IL1-R com activação da BTK e NF-kB Sinalização.....	12
<b>Figura 2-</b> Esquema do ASO-PCR para a mutação MYD88 L265P.....	20
<b>Figura 3-</b> Electroforese em gel de agarose do produto do ASO PCR.....	23
<b>Figura 4-</b> Avaliação da média de intensidade de fluorescência para cada monoclonal do painel EuroFlow, tendo em conta o diagnóstico e a mutação MYD88 L265P.....	28
<b>Figura 5-</b> Rácio de média de intensidade de fluorescência (MIF) entre os Linfocitos B patológicos e os Linfocitos B normais (LBp/LBn) para os anticorpos monoclonais: a) rácio CD38, b) rácio CD23, c) rácio CD79b, d) rácioCD27.....	30

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Critérios de diagnóstico de Macroglobulinémia de Waldenström.....	4
<b>Tabela 2-</b> Classificação da Macroglobulinémia de Waldenström e doenças associadas.....	5
<b>Tabela 3-</b> Critérios para início de terapêutica na MW.....	6
<b>Tabela 4-</b> Painel <i>EuroFlow</i> para avaliação dos Síndromes Linfoproliferativos-B.....	9
<b>Tabela 5-</b> Diferenças diagnósticas das Gamopatias Monoclonais IgM...	15
<b>Tabela 6-</b> Primers para pesquisa da mutação MYD88 L265P.....	19
<b>Tabela 7-</b> Características clínico-laboratoriais da população estudada à data de diagnóstico.....	22
<b>Tabela 8-</b> Mutação MYD88 L265P por grupo de doentes em estudo.....	24
<b>Tabela 9-</b> Características clínico-laboratoriais de acordo com a presença da mutação MYD88 L265P.....	25
<b>Tabela 10-</b> Características clínico-laboratoriais de acordo com o estado mutacional do MYD88.....	26
<b>Tabela 11-</b> Avaliação do imunofenótipo através dos rácios (/linfócitos B patológicos/ linfócitos B normais).....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Akt Pathway or PI3K**-Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e Akt ou Protein Kinase B

**AKT/ERK**- Cinases reguladas por sinal extracelular

**CD**- Cluster de diferenciação

**CXCL12**- SDF-1 factor derivado do estroma1, também chamado CXCL12

**CXCR4**- Receptor de quimiocina tipo 4

**ERK**- Receptor de quimiocina tipo 4

**FN-kB** - Fator nuclear-Kappa B

**Igs**- Imunoglobulinas

**IL-1R1** - Interleukina 1, receptor tipo I

**IL-1RAP**- Proteína acessória do receptor Interleukin 1

**IL**-interleucina

**IRAK**- Cinase associada ao receptor de interleucina

**IκBα**- Fator nuclear do polipéptido leve kappa, do gene inibidor alfa das células B.

**JAK-STAT**- Janus Kinase (JAK) Transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT)

**LAIR-1**- Receptor tipo-imunoglobulina associado a leucócitos 1

**LDGC tipo ABC**-Linfoma difuso de grandes células do tipo células B activadas.

**LEZM**-Linfoma Esplénico de Zona Marginal

**LF** -Linfoma Folicular

**LLC** -Leucemia Linfocítica Crónica

**LLP** -Linfoma Linfoplasmocítico

**LZM**-Linfoma de Zona Marginal

**MAPK**- Proteína quinases ativadas por mitógenos

**GMSI**- Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado

**MW**-Macroglobulinemia de Waldenstrom

**MYD88** - Gene de diferenciação mielóide de resposta primária 88

**SDF-1**- Factor derivado do estroma1

**TLR** - Receptor Toll/IL-1

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Linfoma Linfoplasmocítico**

O Linfoma Linfoplasmocítico (LLP) é definido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) 2008, como uma neoplasia de linfócitos B de pequenas células composta por linfócitos, linfócitos plasmocitóides e plasmócitos. Geralmente envolve a medula óssea (MO), por vezes atinge os nódulos linfáticos e o baço, não cumprindo critérios de qualquer outra neoplasia de células B com diferenciação plasmocítica (1).

A Macroglobulinemia de Waldenström (MW) é o LLP mais frequente e caracteriza-se pela acumulação descontrolada de Imunoglobulinas do tipo M (IgM), secretadas pelas células linfoplasmocíticas, resultando numa gamapatia monoclonal do tipo IgM que se apresenta com envolvimento da medula óssea (2). A MW corresponde a cerca de 95% dos LLP, sendo menos frequentes os LLP com gamopatias monoclonais dos tipos IgA, IgG ou não secretores (3) .

Clínica e patologicamente a MW representa um estádio intermédio entre as doenças linfoproliferativas crónicas e as discrasias de células plasmáticas, com características que podem variar entre ambas (4). Por este motivo, distinguir LLP/MW de outros linfomas B de pequenas células, de Mieloma Múltiplo ou de outras patologias linfoproliferativas B de células maduras, tais como: Linfoma da Zona Marginal (LZM), Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma Linfocítico (LLC/LL) e Linfoma Folicular (LF) pode ser difícil, dada a variedade de linfócitos maduros com vários graus de diferenciação plasmática que estas entidades podem apresentar (3).

## **1.2 Linfoma Linfoplasmocítico/ Macroglobulinemia Waldenström Versus Linfoma de Zona Marginal**

A distinção entre LLP/MW e o LZM pode ser complicada, uma vez que geralmente ambos envolvem a medula óssea e estão frequentemente associados a uma paraproteína IgM.

De acordo com a classificação da OMS de 2008, o Linfoma de Zona Marginal (LZM) é dividido em três categorias: (a) LZM extranodal do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), (b) LZM nodal (com ou sem células monocitóides-B) e (c) LZM esplênico (com ou sem linfócitos vilosos) (5). De entre os três, diferenciar LLP/MW de linfoma MALT é, em geral, o mais simples, uma vez que tipicamente o linfoma MALT não está associado a gamapatia monoclonal e por outro lado, o envolvimento extranodal, especialmente em locais como o trato gastrointestinal e glândulas salivares, é pouco comum no LLP/MW. O LZM nodal é caracterizado por um padrão de envolvimento parafolicular, sendo que o LZM com células monocitóides pode estar associado a folículos reativos. A presença de células B monocitóides pode apoiar o diagnóstico de LZM nodal, no entanto morfológicamente pode por vezes ser complexa a distinção com certos estadios da LLMW na ausência de outros marcadores. O LZM esplênico apresenta muitas vezes diferenciação da célula plasmática, assim como níveis elevados de paraproteína do tipo IgM no soro. Por observação do aspirado de medula óssea ou por biópsia, a distinção entre LLP/MW de LZM esplênico é difícil sendo a avaliação histológica do baço necessária para confirmar o diagnóstico(6). Tendo em conta que aproximadamente 10% a 15% dos doentes com MW apresentam esplenomegalia, ainda que de menor dimensão que nos doentes com LZM esplênico, o diagnóstico diferencial entre estas duas patologias pode ser difícil (7).

Dada a escassez de marcadores de diagnóstico para estas entidades, por vezes, é apenas possível assumir um diagnóstico de linfócitos B de pequenas células com diferenciação plasmocítica, não sendo possível um diagnóstico diferencial claro (2)(6).

## **1.3 Macroglobulinémia de Waldenström**

### **1.3.1 Características clínico-patológicas**

A MW é uma doença hematológica rara, com uma incidência na Europa e Estados Unidos de 3.6-5.5 casos por milhão de pessoas/ano (4). Ocorre em adultos, com média de idade ao diagnóstico de 60 anos e com ligeiro predomínio do sexo masculino. Em cerca de 25% dos doentes tem sido descrita uma predisposição familiar que varia entre a presença de patologia de células B e a existência de vários casos de MW (8).

A MW é uma neoplasia linfoproliferativa B, que se caracteriza pela presença na medula óssea (MO) de uma infiltração de células linfoplasmocíticas secretoras de imunoglobulina monoclonal do tipo IgM. Uma minoria dos doentes (15-30%) pode apresentar envolvimento extra-medular, como linfadenopatias ou hepatoesplenomegalia (2).

As características clínicas mais comuns são anemia, devida à invasão medular e os sintomas daí decorrentes como: fadiga, cansaço e falta de ar. Devido às características fisiopatológicas desta entidade que se caracteriza pela elevação dos níveis de IgM, os doentes podem apresentar sinais e sintomas associados, como hiperviscosidade, crioglobulinemia, neuropatia periférica, coagulopatia, aglutininas a frio, erupções cutâneas (síndrome de Schnitzler), alterações no tracto gastrointestinal, sistema nervoso central (síndrome de Bing - Neel) ou renais. Raramente apresentam deposição amilóide (9). Os critérios de diagnóstico de MW são apresentados de forma resumida na Tabela 1.

**Tabela 1. Critérios de diagnóstico de Macroglobulinémia de Waldenström. (Adaptado de Castillo et al. 2013)**

Gamapatia Monoclonal IgM de qualquer concentração
Infiltração Medular por linfócitos pequenos com diferenciação plasmocítica
Padrão de infiltração intertrabecular na medula óssea
Marcação de superfície positiva para IgM+, CD19+, CD20+, CD22+, CD25+, CD27+, FMC7+, CD5±

A MW pode ser assintomática e sintomática. Em geral a MW sintomática é precedida por uma Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI) do tipo IgM ou de MW assintomática. A GMSI IgM caracteriza-se pela presença de gamapatia IgM <3 g/dL e infiltração da MO por células linfoplasmocíticas <10%, enquanto que a MW assintomática é caracterizada por gamapatia IgM ≥3g/dL ou ≥10% de células linfoplasmocíticas na MO na ausência de sintomas de MW (10).

A abordagem do “International Workshop on Waldenstrom Macroglobulinemia de 2003” é a mais utilizada e define a MW como um LLP com gamapatia monoclonal do tipo IgM de qualquer concentração com envolvimento da medula óssea podendo ser assintomática ou sintomática conforme se apresenta na Tabela 2.

**Tabela 2. Classificação da Macroglobulinemia de Waldenström e doenças associadas**

(Adaptado de Owen *et al.* 2003)

	Proteína IgM Monoclonal *	Infiltração da medula óssea †	Sintomas de IgM	Sintomas de infiltração tumoral§
<b>MW</b>				
<b>Sintomática</b>	+	+	+	+
<b>Assintomática</b>	+	+	-	-
<b>Transtornos tipo IgM‡</b>	+	-(b)	+	-
<b>GMSI</b>	+	-(b)	-	-
<p>* O painel considerou ser inadequado definir uma concentração de IgM para distinguir GMSI de WM. No entanto, é importante notar que a concentração de IgM raramente ou nunca é &gt; 3 g/dL em GMSI.</p> <p>† Doentes com infiltração inequívoca da medula óssea pelo linfoma linfoplasmacítico serão considerados como MW, enquanto os doentes sem evidência de infiltração serão considerados como GMSI. No entanto, reconhece-se que em alguns doentes é difícil demonstrar infiltração da medula óssea, pelo que, na ausência de evidência morfológica de infiltração da medula óssea, a detecção de células B clonais por citometria de fluxo ou por técnicas de biologia molecular, deverá ser efectuada.</p> <p>‡ Existem doentes que apresentam sintomas atribuíveis à proteína monoclonal IgM, mas sem evidência de linfoma. Esses doentes podem apresentar crioglobulinemia sintomática, amiloidose, ou fenómenos auto-imunes, tais como neuropatia periférica e crioaglutinas. É conveniente considerar esses doentes como um grupo distinto clinicamente o qual se designa como "transtornos relacionados-IgM".</p> <p>§ Os sintomas atribuíveis à infiltração tumoral irão incluir: sintomas constitucionais, citopenia (s) ou organomegalia.</p>				

Doentes com GMSI IgM podem progredir para MW ou outra doença linfoproliferativa B, com uma probabilidade estimada de 1.5-3% ano (11). Doentes com MW assintomática tem 55% de risco de progressão para MW sintomática (12).

Apesar da natureza indolente da MW, o seu prognóstico é heterogéneo. A presença de citopenias, níveis elevados de  $\beta 2$ -microglobulina, albumina baixa, proteína monoclonal IgM sérica, organomegalias e idade avançada são considerados factores de prognóstico desfavorável. O índice internacional de prognóstico (IPSS) para MW proposto por Morel *et al.* (2015) é o mais utilizado e baseia-se em 5 factores de risco: idade >65 anos, hemoglobina  $\leq 11.5$ g/dL, plaquetas  $\leq 100 \times 10^9$ ,  $\beta 2$  microglobulina >3mg/L e proteínas séricas monoclonais >7g/dL. O baixo risco é caracterizado por valores de 0 a 1 sem



considerar a idade, >2 alto risco e o risco intermédio caracterizado por dois achados ou idade > 65 anos (13).

Actualmente, os critérios para início da terapêutica são baseados na presença de sintomas e no *status* do doente (Tabela 3) (2). O início do tratamento é, no entanto, razoável em doentes que demonstram aumento dos níveis de IgM, com sinais ou sintomas associados à progressão da doença. Em doentes nos quais é necessário um controlo imediato da doença, tais como doentes com hiperviscosidade sintomática, coagulopatia, crioglobulinemia, ou doença de aglutininas a frio, deverá ser efectuada plasmaferese de modo a tentar uma rápida redução da paraproteinemia IgM (14).

As opções terapêuticas actuais para a MW incluem o uso de agentes alquilantes (clorambucil e ciclofosfamida), análogos de nucleosídeos (fludarabina e cladribina), anticorpo monoclonal rituximab (anti-CD20) e o inibidor do proteosoma (bortezomib).

**Tabela 3. Critérios para início de terapêutica na MW. Adaptado de *Castillo et al. 2013* (2)**

Sintomas constitucionais (febre, suores nocturnos, cansaço, anemia e/ou perda de peso)
Linfoadenopatias e ou esplenomegalia sintomática em progressão
Anemia Hb $\leq 10$ g/dL
Plaquetas $< 100 \times 10^9/L$
Síndrome de hiperviscosidade
Neuropatia periférica sintomática
Amiloidose sistémica
Crioglobulinemia sintomática

#### **1.4. Abordagem diagnóstica da Macroglobulinémia de Waldenström**

#### 1.4.1 Achados laboratoriais

Os doentes com LLP/MW apresentam normalmente anemia ligeira, linfocitose e trombocitopenia. A anemia é em geral normocítica e normocrômica. No esfregaço de sangue periférico podem encontrar-se linfócitos plasmocitóides caracterizados por núcleos excêntricos e citoplasma mais abundante e basófilo. A formação de rouleaux também é característica. As trombocitopénias severas são encontradas apenas em estadios avançados da doença (6).

A avaliação laboratorial do soro do doente através do estudo do perfil proteico permite demonstrar a presença, a quantidade e o tipo de proteína anormal presente. O doseamento por densitometria ou nefelometria e a caracterização da paraproteinemia são essenciais, assim como a eletroforese das proteínas do soro que normalmente deve demonstrar presença de imunoglobulina monoclonal, visualizada como um pico na zona gama. Na MW a utilização da imunofixação é recomendada para caracterizar o tipo de cadeia pesada e leve presente em cada amostra. A presença de proteína monoclonal é caracterizada por uma banda bem definida associada com uma classe de cadeia pesada (IgM, IgG, ou IgA) e da banda de igual mobilidade, que reage com cadeias *kappa* ou *lambda*. Este método tem grande aplicação na identificação de proteínas M presentes em pequenas quantidades, que são difíceis de detectar por outros métodos. Devido às características físico-químicas únicas das paraproteínas, doentes com os mesmos níveis de IgM podem ter viscosidades divergentes. A maioria dos doentes com LLP /MW são sintomáticos quando a concentração de IgM no soro é acima de 3,0 g/dL (14).

Na medula óssea o padrão de infiltração pode ser difuso, intersticial ou paratrabecular. Nos esfregaços de aspirado de medula óssea os linfócitos podem ser em número normal ou aumentado. As células neoplásicas são classicamente descritas como apresentando um espectro, desde pequenos linfócitos a linfócitos plasmocitóides ou até maduros (6). No gânglio linfático o padrão clássico é o de uma expansão paracortical de pequenos linfócitos associada a números variáveis

de células plasmáticas, muitas vezes com corpos de Dutcher. A maior parte dos linfócitos são pequenos, monocitóides, centrolásticos ou imunoblásticos (8).

#### **1.4.2 Imunofenótipo da Macroglobulinemia de Waldenström**

O imunofenótipo dos linfócitos B da MW caracteriza-se pela expressão de marcadores de superfície como IgM e antígenos pan-B CD19, CD20, CD22 e CD79b, com intensidades de fluorescência que podem ir de moderada a forte. A presença de células plasmáticas monoclonais é identificada pela expressão CD38, CD138 e da IgM citoplasmática sendo, normalmente positivas para CD45 e CD19, ao contrário do que acontece com o mieloma múltiplo (MM) em que as células são geralmente CD19 negativas e com baixa expressão para CD45 (14). Na MW as células plasmáticas podem estar sub-representadas em amostras de aspirado de medula óssea, não sendo por vezes possível demonstrar a sua presença e/ou clonalidade (15). De acordo com as orientações de consenso do Segundo Workshop Internacional sobre MW (16), assim como na actual classificação da OMS de 2008, os linfócitos da MW são tipicamente negativos para CD5, CD10 e CD23. No entanto, podem ocorrer excepções ao imunofenótipo tipicamente descrito. Em 2005 Konoplev *et al.* e Hunter *et al.* demonstraram baixa expressão de CD5, CD10 e CD23 na MW (6)(17). Mais recentemente, um grupo de investigadores da Clínica Mayo descreveu a expressão de CD5 parcial e/ou de baixa expressão em cerca de 40% dos casos MW (14). Em 2014, Paiva *et al.* descreveu um fenótipo de MW com CD22 de baixa expressão, CD23-, CD25+, CD27+, IgM+ (15). Em 89% dos casos o clone de células B de Waldenström é também caracterizado pela ausência de CD5, CD10, CD11c e CD103, em contraste com a maioria dos outros síndromes linfoproliferativos maduros, com excepção do linfoma da zona marginal (LZM) (15). Um aumento do número de mastócitos na medula óssea também pode ajudar a diferenciar a MW de outros linfomas de células B indolentes, (2)(6).

A avaliação do perfil imunofenotípico da MW por citometria de fluxo não é consensual, no entanto, as recomendações do grupo *EuroFlow* preconizam que os LLP/MW e os LZM devem ser estudados de acordo com o painel apresentado na Tabela 4. O imunofenótipo pressupõe marcadores como: CD19+, CD22+, CD20+, IgM+, CD38 variável, LAIR+/-, CD27+, CD23-, CD10-, CD11c-. A população plasmocitária tem um imunofenótipo de célula plasmática normal, por vezes com restrição das cadeias leves de superfície. É de notar que a ausência de uma população clonal de plasmócitos não exclui o diagnóstico. Em relação aos LZM o imunofenótipo normalmente descrito apresenta CD19+, CD22+, CD20+, CD11c+, CD38 variável, IgM+/-, LAIR1+/-, CD27+, CD23-, CD10-, no entanto, não é um imunofenótipo característico e assume-se como um diagnóstico de exclusão (18).

**Tabela 4. Painel *EuroFlow* para avaliação dos Síndromes Linfoproliferativas B. Adaptado de van Dongen *et al.* (2012) (18).**

Tubo	Pacific Blue	Pacific Orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7	Objectivo
1	CD20 e CD4	CD45	CD8 e smlg	CD56 e smlgk	CD5	CD19 e TCR	smCD3	CD38	Tubo LST; DLPC-B
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43	LLC vs DLPC-B quando combinado com LST
3	CD20	CD45	CD31	LAIR1	CD11c	CD19	smlg	CD81	Subclassificação de DLPC não
4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CXCR5	CD49d	LLC (ex: HCL, MCL, FL, MZL, LLP, DLBCL e outras DLPC-B)
5	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLADR	CD19	CD27		

LST-lymphoide single tube, DLPC-B -chronic lymphoproliferative disorders-B, LLC-chronic lymphocytic leukemia, HCL- hairy cell leukaemia, MCL- mantle cell lymphoma, FL-follicular Lymphoma, LZM- marginal zone lymphoma, LLP- Lymphoplasmacytic Lymphoma, DLBC-Diffuse large B-cell lymphoma, B-CLPD –B- Chronic lymphoproliferative disorders.

### 1.4.3 Alterações citogenéticas e moleculares

A alteração citogenética mais comum nos doentes com MW é a deleção do braço longo do cromossoma 6 (6q), que ocorre em cerca de 40-50% dos doentes (15). Outras anomalias citogenéticas têm sido descritas, tais como trissomia 4, trissomia 5, monossomia 8 e deleção do braço longo do cromossoma 20 (10).

Relativamente à patogénese molecular, há mais de uma década que se reconhece um papel central do factor nuclear-kappa B (NF-kB) na activação da tumorigénese da MW (19). No entanto, apenas recentemente foi identificada uma mutação somática no gene *MYD88* (Gene de diferenciação mielóide de resposta primária 88) em cerca de 80-91% dos doentes com MW, *MYD88* L265P (19)(20). Esta mutação pontual, foi identificada apenas numa pequena percentagem de doentes com neoplasias de células B com características sobreponíveis à MW, pelo que poderá ser útil no diagnóstico diferencial entre LLP, LZM e MM ou mesmo na reclassificação destas patologias. A mutação *MYD88* L265P parece ter um papel crucial na activação da via canónica do NF-kB (10).

### 1.5 Descoberta da mutação *MYD88* L265P

O gene *MYD88*, que codifica a proteína MYD88, foi identificado em 1990 como um gene de resposta primária de diferenciação mielóide (21). Em 2012 a sequenciação do genoma de doentes com MW permitiu a identificação de uma variante somática do gene *MYD88* (cromossoma 3p22.2) na posição 265, que resulta na alteração do aminoácido leucina (L) para prolina (P) (L265P) (22)(23). Estudos iniciais demonstraram a presença da mutação *MYD88* L265P em 80-91% dos doentes com MW (24), resultados posteriormente corroborados por vários estudos independentes (4)(22). Esta mutação está presente em aproximadamente 50-80% dos doentes com GMSI do tipo IgM, 14-29% dos linfomas B difusos de

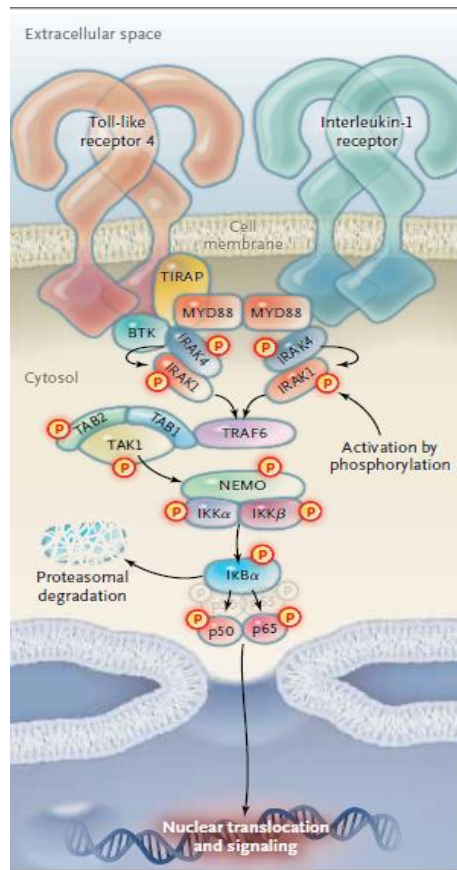
grandes células do tipo ABC e em apenas 3-9% dos doentes com LZM, MM e LLC (12) (22).

### 1.6 A Proteína MYD88

O gene *MYD88*, que codifica a proteína MYD88, foi identificado em 1990 como um gene de resposta primária de diferenciação mielóide (21). Trabalhos de Muzio *et al.* (1997) e Wesche *et al.* (1997) identificaram a MYD88 como proteína adaptadora do receptor de interleucina 1 (IL-1R1) e demonstraram que a MYD88 induz a transcrição do factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) em resposta à sinalização através do IL-1R1 (24) (25). Estruturalmente o MYD88 é composto por um domínio Toll/IL-1R (TIR) no terminal carboxílico e por um domínio de morte no seu terminal amino (19).

Em modelos animais está descrito, que os défices de MYD88 em ratos provocam defeitos na proliferação de células T, bem como a indução de proteínas de fase aguda e citocinas em resposta a IL-1. Medzhitov *et al.* (1997), utilizando estudos de sobre-expressão, e Kawai *et al.* (1997), em estudos com ratos com deficiência de MYD88, comprovaram que o MYD88 é crítico para a sinalização TLR(26) (27). Em seres humanos a ausência de MYD88 provoca infecções bacterianas piogénicas.

Sabe-se actualmente que o MYD88 é uma proteína adaptadora crucial para a sinalização através da superfamília dos receptores IL-1/IL-18/Toll e é essencial para a indução de NF- $\kappa$ B e sinalização das proteínas cinases activadas por mitogénicos (MAPK) em resposta a IL-18 (28). O MYD88 liga-se às serinas-treonina kinases IRAK1 e IRAK2, actuando como um adaptador de ligação à IL-1R1 a jusante das IRAK kinases (Figura 1).



**Figura 1- Sinalização celular da via TLR e IL-1-R com ativação da BTK e NF-κB. Adaptado de Treon et al. (2012) (11)**

Após estimulação do IL-1R ou do TLR, o MYD88 é recrutado para o complexo receptor activado como um homodímero e vai formar um complexo com IRAK4, levando à ativação da IRAK1 e IRAK2. Isto, por sua vez, leva à ativação do factor de necrose tumoral associado 6 (TRAF6) e à ativação de NF-κB através de fosforilação de Iκβ – α (29) (Figura 1).

## 1.7 A mutação *MYD88* L265P

Ngo *et al.* (2011) através do estudo de doentes com Linfoma B Difuso de Grandes Células (LBDGC) tipo “activated B-cell” (ABC) com mutação *MYD88* L265P demonstrou que a sobreexpressão da mutação *MYD88* L265P promove um aumento da sobrevivência das células tumorais em comparação com células wild-type (WT) *MYD88* (19). Do mesmo modo, observou-se que a mutação *MYD88* L265P em linhas celulares imortalizadas de doentes com MW promove um aumento de sobrevivência destas células, o que é consistente com uma mutação de ganho de função. Estudos semelhantes demonstraram que a inibição da sinalização *MYD88*/IRAK diminui a actividade do NF- $\kappa$ B e a sobrevivência das células *MYD88* L265P. Adicionalmente, Yang *et al.* (2013) demonstrou que na MW com *MYD88* L265P a inibição do *MYD88* é acompanhada pela diminuição da activação da tirosina kinase de Bruton (BTK), e que a sobreexpressão do *MYD88* L265P aumenta a fosforilação da BTK.

Em conjunto, trabalhos de Ngo *et al.* e de Yang *et al.* demonstram ainda que as proteínas IRAK e BTK induzem, de forma independente, a activação do NF- $\kappa$ B, sugerindo um modelo em que a mutação *MYD88* L265P promove a activação do NF- $\kappa$ B por duas vias independentes que sinalizam através da proteína kinase BTK e/ou via IRAK1/IRAK4. Deste modo, o uso combinado de inibidores IRAK e BTK poderá ser benéfico para a eliminação das células que apresentem a mutação *MYD88* L265P (1).

A mutação *MYD88* L265P está presente em cerca de 86-91% dos doentes com MW, na maioria dos casos em heterozigotia, embora também tenha sido descrita em homozigotia (30). Estudos posteriores demonstraram a presença da mutação *MYD88* L265P em aproximadamente 50-80% dos doentes com GMSI do tipo IgM. Estes achados sugerem que esta mutação somática poderá ser um evento oncogénico precoce para o desenvolvimento da MW (31). Varettoni *et al.* observaram que a presença da mutação *MYD88* L265P em doentes com GMSI IgM representa um factor prognóstico independente de progressão para MW. Neste estudo verificaram que doentes com GMSI IgM e mutação *MYD88* L265P



apresentam ao diagnóstico níveis de IgM mais elevados, diminuição de IgG e IgA e elevada incidência de proteinúria de Bence-Jones (22). Ainda num estudo de Paiva *et al.* (2014) foram descritos, através da análise de componentes principais por citometria fluxo multidimensional, perfis fenotípicos altamente sobreponíveis para as células B clonais de GMSI IgM assintomático e doentes com MW sintomáticos (7).

#### **1.7.1 Mutação *MYD88* L265P como marcador diagnóstico no LLP/MW**

A identificação da mutação *MYD88* L265P nas MW tem implicações no diagnóstico de doentes com suspeita de MW, assim como nas opções terapêuticas (24). Não sendo exclusiva desta patologia, a presença da mutação *MYD88* L265P deverá apenas sustentar o diagnóstico de MW, isto porque não discrimina entre GMSI IgM e MW e porque a sua presença foi demonstrada em outros linfomas, incluído o Linfoma B Difuso de Grandes Células do tipo ABC. No entanto, a pesquisa desta mutação poderá ser uma mais-valia no diagnóstico diferencial entre MW/LLP e outras entidades com características clínico-laboratoriais sobreponíveis, tais como o LZM, Mieloma Múltiplo IgM ou LLC com diferenciação plasmocítica, em que a mutação *MYD88* L265P está presente numa minoria dos casos (3-9%), não afastando a hipótese de serem LLP/MW. Adicionalmente, um estudo recente sugere que níveis mutacionais elevados de *MYD88* L265P na MO poderão estar relacionados com evolução para MW e que a carga mutacional poderá ajudar a discriminar GMSI IgM e MW, assim como doentes GMSI IgM com maior risco de progressão (32). Alguns autores também sugerem que o uso de técnicas de biologia molecular quantitativas poderá ser útil na avaliação da resposta terapêutica (4).

As características mais relevantes que distinguem as patologias com níveis de IgM elevados encontram-se descritas na Tabela 4.

Tabela 5- Diferenças diagnósticas das gamopatias monoclonais IgM. Adaptada de Kapoor et al. 2015 (14)

	GMSI IgM	MW assintomática	MW sintomática	MM IgM	Amiloidose	LZM
<b>Concentração sérica de IgM</b>	<3g/dL	≥3g/dL	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Baixa
<b>Infiltração medular %</b>	<10%	≥10%	≥10%	≥10%;PC	Normal /PC/LLP	Intertrabecular/ Intrasinusoidal
<b>Sintomas/órgãos lesados</b>	Não	Não	Sim <sup>b</sup>	Sim <sup>c</sup>	Sim <sup>d</sup>	Sim <sup>e</sup>
<b>Hiperviscosidade</b>	Não	Não	Sim	Pouco frequente	Pouco frequente	Pouco frequente
<b>Alterações citogenéticas</b>	s/ del.6q	c/ del.6q	del.6q (30-50%) e ausência rearr IgH	Podem ter t(11;14) ou rearr IgH	Podem ter t(11;14)	+3q (19%); +5q (10%); Del7q (19%)
<b>MYD88 L265P</b>	Positivo (~80%)	Positivo (~90%)	Positivo (~90%)	Negativo	Negativo	Negativo
<b>Imunofenótipo</b>	-	CD56-	CD56- CD25+(88%) CD103-	CD56+ CD138+ CD19- CD45-	-	CD22+ CD11c+ CD25- CD25+(44%) CD103+(40%)
<b>Risco de transformação</b>	1,5% ano	1 <sup>os</sup> 5 anos: 12% >10 anos: 68%	5-10% para LDGC	-	-	

**Abreviaturas:** IgM, Imunoglobulina M; LLP, linfoma lymphoplasmacítico; GMSI, gamapatia monoclonal de significado indeterminado; N/A, não aplicável; PC, células plasmáticas; WM,Waldenström macroglobulinemia, MM; Mieloma Múltiplo; LZM, Linfoma de Zona Marginal.

**b-** Sintomas constitucionais: hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, hiperviscosidade, envolvimento orgânico, e raramente lesões líticas.

**c-** Sintomas CRAB (hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas ).

**d-** Órgãos tipicamente envolvidos: rins, coração, nervos, língua, trato gastrointestinal e fígado. Doentes com amiloidose do tipo IgM de cadeia leve (AL) têm, frequentemente, envolvimento pulmonar, linfático, do nervo periférico e, mais raramente, cardíaco. A concentração de cadeias leves livres tende a ser mais baixa comparativamente com a amiloidose não IgM.

**e-** Envolve principalmente baço; as linfadenopatias são raras.

#### 4.4 Mutação MYD88 L265P e novos alvos terapêuticos

Actualmente sabe-se que a mutação MYD88 L285P nas células tumorais origina a activação do factor nuclear NF-κB através de duas vias de sinalização distintas que envolvem a Bruton Tirosina Kinase (BTK) e os receptores IRAK1 e IRAK4, o que justifica que os doentes com esta mutação possam beneficiar da terapêutica com inibidores da proteína kinase BTK (24). O ibrutinib, um inibidor

oral da BTK, demonstrou induzir apoptose nas células de doentes com MW que apresentam a mutação *MYD88* L265P e tem sido utilizado em doentes refractários aos tratamentos de primeira linha. Para além do Ibrutinib, estão em desenvolvimento clínico inibidores das proteínas IRAK (33).

Posteriormente à descoberta da mutação *MYD88* L265P, Hunter *et al* (2013) descreveram a presença de mutações somáticas no gene *CXCR4* em 30% dos doentes com MW. Estas mutações são semelhantes às descritas na linha germinal nos doentes com WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, and Myelokathexis) e ocorrem no domínio carboxílico C-terminal que contém os locais de fosforilação que regulam a sinalização CXCR4-SDF-1a (CXCR12). Estudos *in vitro* demonstraram que células tumorais com mutação no gene *CXCR4* apresentam um aumento de activação da via CXCR4-CXCR12 com aumento da expressão de factores de sobrevivência (*AKT* e *ERK*) e diminuição de apoptose induzida pelo ibrutinib (34). Na MW, mutações no gene *CXCR4* co-ocorrem com a mutação *MYD88* L285P e estão associadas a baixas taxas de resposta ao Ibrutinib.

Em doentes com MW, Treon *et al.* (2014) demonstraram que as mutações *MYD88* L265P e no gene *CXCR4* produzem diferenças importantes na apresentação clínica em doentes com WM, nomeadamente, na infiltração medular, presença de doença extra-medular, níveis séricos de IgM, sintomatologia ao diagnóstico e sobrevida global (35).

Estas descobertas recentes oferecem perspectivas futuras no sentido de considerar as mutações *MYD88* L265P e *CXCR4* como marcadores prognósticos e potenciais alvos terapêuticos na WM (19)(36).

## 2. OBJETIVOS

Estudos recentes identificaram a presença da mutação *MYD88* L265P em 80-100% dos doentes com Macroglobulinemia de Waldenström e em aproximadamente 47-87% dos doentes com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado do tipo IgM (19). Esta mutação parece ser pouco frequente nos Linfomas de Zona Marginal, Mieloma Múltiplo e Leucemia Linfocítica Crônica (3-9%).

O principal objetivo deste trabalho foi definir a prevalência da mutação *MYD88* L265P num grupo de doentes com suspeita diagnóstica de Linfoma Linfoplasmocítico/Macroglobulinemia de Waldenström.

Os objetivos específicos foram correlacionar a presença/ausência da mutação *MYD88* L265P com:

- características clínicas e laboratoriais, incluindo, diagnóstico, idade, sexo, hemoglobina, leucócitos, plaquetas e níveis séricos de IgM;
- Fenótipo dos linfócitos B clonais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 População estudada**

Foram estudados 23 doentes seguidos na consulta de Hematologia do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra EPE, Centro Hospitalar de Leiria-Pombal EPE e do Centro Hospitalar Tondela Viseu EPE, no período de 2010 a 2014. De acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008. 15 doentes foram diagnosticados com MW, 4 com Linfoma da Zona Marginal, 2 com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado e 2 com Linfoma Linfoplasmocítico.

#### **3.2 Amostras**

Os estudos foram efectuados em amostras de medula óssea e/ou sangue periférico em EDTA tripotássico.

#### **3.3 Estudos moleculares**

##### **3.3.1 Extracção de DNA**

O DNA genómico foi obtido a partir de 200 µL de sangue total ou medula óssea utilizando o kit DNA Blood Mini Kit (Quiagen<sup>TM</sup>, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante.

### 3.3.2 Pesquisa da mutação *MYD88* L265P por reacção em cadeia de polimerase (PCR) alelo-específico (ASO-PCR)

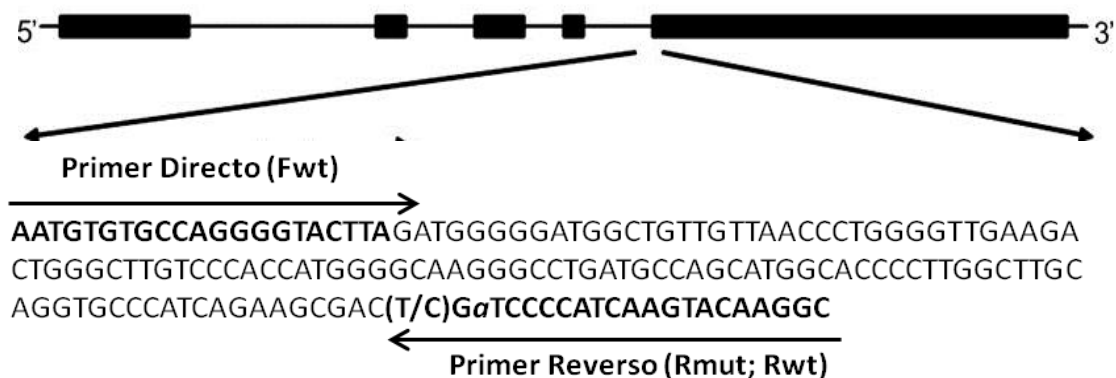
A pesquisa da mutação pontual *MYD88* L265P foi efectuada pela técnica de PCR alelo-específico (ASO-PCR) de acordo com Xu *et al.* (2013). Nesta técnica os primers desenhados incluem um *mismatch* no 3º nucleótido a 3' de modo a aumentar a discriminação do alelo normal (wild-type, wt) do alelo mutado (mut), e aumentar a sua especificidade (32).

Foram utilizados dois primers reversos para diferenciar o alelo normal (T) do alelo mutado localizados no exão 5 do gene *MYD88* e um primer directo comum localizado no intrão 4 do gene *MYD88* (Tabela 6).

**Tabela 6 – Primers para pesquisa da mutação *MYD88* L265P**

<b>MYD88-Rwt</b>	5'– GCCTTGACTTGATGGGGAaCA – 3'
<b>MYD88-Rmut</b>	5' – CCTTGACTTGATGGGGAaCG – 3'
<b>MYD88-F</b>	5' – AATGTGTGCCAGGGGTACTTA – 3'

Por amostra foram efectuadas 2 reacções de PCR, uma para amplificar o alelo normal (primers F e Rwt) e outra para amplificar o alelo mutado (primers F e Rmut). Para cada reacção de PCR foram utilizados aproximadamente 50 ng DNA (~2 µL de DNA genómico), 50nM de primer e a 1 U de enzima *Platinum* Taq DNA polymerase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) num volume final de 25 µL. A reacção de PCR foi efectuada no termociclador C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) com uma reacção enzimática a 95°C, 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C 30 segundos, annealing a 57°C 30 segundos, extensão a 68°C 30 segundos, com extensão final 68°C durante 5 minutos. Os produtos amplificados têm 159 pares de bases (Figura 3).



**Figura 2. Esquema do ASO-PCR para a mutação *MYD88* L265P. Adaptado de Xu L. *et al* (2013) (32).**

### 3.3.3 Electroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR amplificados (159 pb) foram separados por electroforese em gel de agarose 2% (Ultrapure™ agarose, Invitrogen) corado com Sybr® Safe DNA (Molecular Probes, Invitrogen). Os fragmentos de amplificação foram visualizados e fotografados através de um transiluminador de ultravioleta (Kodac EDAS 290; Vilber Lourmat – UV).

### 3.4 Imunofenotipagem

O estudo imunofenotípico da medula óssea e/ou sangue periférico foi efectuado por citometria de fluxo, utilizando o citómetro BD FACSCanto™ (BD Bioscience San Jose,CA) de 8 cores (37) com 3 lasers e 8 fotomultiplicadores que permite detectar os seguintes fluorocromos: Violeta; Pacific Blue™, AmCyan (455, 488 nm) Azul: FITC, PE, PerCP or PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 (525, 575, 678 or 695, 785 nm) e Vermelho APC, APC-Cy7 (660, 785 nm). A monitorização do equipamento foi feita utilizando as Cytometer Setup Tracking (CST; BD Bioscience San Jose,CA) e as rainbow 8-peak beads (Spherotech, Inc; Lake Forest, IL).

Foi marcado um volume de 100µL de sangue periférico ou medula óssea utilizando uma técnica de marcação directa e lise. Os anticorpos monoclonais foram pipetados nos volumes e fluorescências recomendados pelo Grupo *Euroflow* (37). Os painéis utilizados foram também os recomendados pelo grupo *Euroflow* conforme apresentado na tabela 2 (18). Foram adquiridos 300 000 eventos por amostra. A análise das amostras foi realizada utilizando o *software* FACSDiva 6.1 (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA). Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF).

### 3.5 Análise Estatística

As variáveis numéricas foram descritas por média e intervalo, e as variáveis categóricas por contagem e frequências relativas (percentagem). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para estimar a significância estatística das diferenças entre os linfócitos B normais e patológicos no grupo de doentes *MYD88 L265P*.

Para a análise estatística foi usado o *software* GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para p-value <0.05.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da população em estudo

As características clínico-laboratoriais dos doentes estudados encontram-se sumarizadas na Tabela 5. No total foram estudados 23 doentes, 15 com Macroglobulinemia de Waldenström (MW), 2 com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado tipo IgM (GMSI IgM), 4 com Linfoma da Zona Marginal (LZM) e 2 com Linfoma Linfoplasmocítico (LLP).

**Tabela 7. Características clínico-laboratoriais da população estudada à data de diagnóstico (n=23).**

	MW	GMSI IgM	LZM	LLP	p(valor)
<b>n</b>	15	2	4	2	
<b>Idade (anos)</b>	73 (55-85)	81 (80-82)	74.8 (67-82)	72 (69-75)	0,56
<b>Sexo (F/M)</b>	1/14	1/1	2/2	1/1	-
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	12,8 (9,5-16,6)	13,6 (13,4-13,7)	13,9 (10,7-16,2)	12,9 (12,8-13,1)	0,87
<b>Linfócitos (10<sup>9</sup>/L)</b>	4,6 (1,3-24,1)	1,1 (0,8-1,4)	7,8 (2,6-13,6)	4,2	0,41
<b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b>	207 (66-341)	109 (66-152)	169 (135-209)	158 (97-218)	0,39
<b>IgM (g/L)</b>	16,5 (0,17-60,68)	2,37 (1,9-2,9)	7,8 (0,32-13,6)	0,43 (0,40-0,46)	0,22
<b>IgM &gt;2.3</b>	14/15	1/2	2/4	0/2	-
<b>% células B monoclonais</b>	19 (1-58)	17 (4-29)	41,75 (9-87)	2 (1-3)	0,22

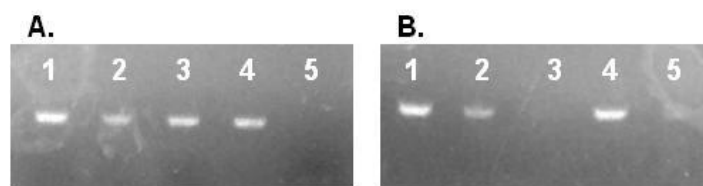
Resultados expressos em valor médio, valor máximo e mínimo entre parênteses. Análise estatística ANOVA. MW-Macroglobulinemias de Waldenström, GMSI - Gamapatia monoclonal de significado indeterminado tipo IgM, LZM- Linfoma da Zona Marginal, GM- Gamapatia Monoclonal, LLP- Linfoma Linfoplasmocítico.

Os 23 doentes estudados tinham idades compreendidas entre os 55 e os 85 anos, 18 do sexo masculino, 5 do sexo feminino. Relativamente aos parâmetros clinico-laboratoriais avaliados não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes grupos. Os valores de hemoglobina situavam-se entre os 9.5 g/dL e os 13,7 g/dL (valores normais ♂: 13.5-18 g/dL ♀: 12.0-16.0 g/dL). O valor de linfócitos entre os  $0,8 \times 10^9/L$  e os  $13,6 \times 10^9/L$  (valor normal  $4,5-11,0 \times 10^9/L$ ), estando o valor de plaquetas entre as  $66 \times 10^9/L$  e as  $341 \times 10^9/L$  (valor normal  $150-450 \times 10^9/L$ ). A concentração de IgM vai do negativo 0.17g/L até valores de 60.68g/L (valor normal 0,4-2,3g/L), ainda que o valor médio na MW seja superior, não difere estatisticamente. Em relação ao clone patológico, foram detectados clones de 1% até 87%, sendo o valor médio superior para o grupo de LZM.

#### 4.1 Pesquisa da mutação *MYD88* L265P

A pesquisa da mutação *MYD88* L265P foi efectuada em DNA de medula óssea ou sangue periférico, por PCR Alelo-Específico (ASO-PCR) (Figura 4).

Dos 23 doentes estudados, em 15 (65,2%) foi detectada a mutação L265P no gene *MYD88*.



**Figura 3** – Electroforese em gel de agarose do produto do ASO-PCR.

A) Reacção para o alelo WT do *MYD88*; B) Reacção para o alelo L265P do *MYD88*.

Linha 1 e 2 : presença da mutação *MYD88* L265P; Linha 3 – ausência da mutação *MYD88*

L265P; Linha 4 – Controlo Positivo para *MYD88* L265P; Linha 5- Branco.

A mutação *MYD88* L265P estava presente em 13/15 (86,7%) doentes com MW, em 1/2 dos GMSI IgM, em 1/4 dos LZM e em 0/2 LLP Tabela 6.

**Tabela 8. Mutação *MYD88* L265P por grupo de doentes em estudo (n=23).**

<b>Entidade</b>	<b><i>n</i></b>	<b><i>MYD88</i> L265P (%)</b>
<b>MW</b>	15	13 (86,7%)
<b>GMSI IgM</b>	2	1
<b>LZM</b>	4	1
<b>LLP</b>	2	0

#### **4.2 Correlação entre a presença da mutação *MYD88* L265P e as características clínico-laboratoriais.**

De acordo com a presença da mutação *MYD88* L265P foram comparadas as características clínico-laboratoriais dos doentes em estudo Tabela 7.

**Tabela 9. Características clínico-laboratoriais de acordo com a presença da mutação *MYD88* L265P.**

	MW (n=15)		GMSI IgM (n=2)		LZM (n=4)	
	MYD88 WT (n=2)	MYD88 L265P (n=13)	MYD88 WT (n=1)	MYD88 L265P (n=1)	MYD88 WT (n=3)	MYD88 L265P (n=1)
<b>Idade (anos)</b>	68,5 (55-82)	72 (67-85)	82	80	76,3 (67-82)	70
<b>Sexo (F/M)</b>	1/1	1/12	0/1	1/0	2/1	0/1
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,6 (13,4-13,7)	12,7 (9,5-16,6)	13,7	13,4	13,1 (10,7-16,2)	16,2
<b>Linfócitos (10<sup>9</sup>/L)</b>	3,8 (2,5-5,1)	4,8 (1,3-24,1)	0,8	1,4	5,8 (2,6-11,6)	13,6
<b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b>	109 (66-152)	223,7 (89-341)	152	66	180,3 (135-209)	135
<b>IgM (g/L)</b>	34,92 (8,9-60,9)	13,47 (0,17-32,5)	2,86	1,88	6,33 (0,32-13,6)	1,38
<b>% células B clonais</b>	1 (1-1,5)	22 (1-58)	29	4	38 (9-87)	54
<b>Cadeias K/λ</b>	2/0	9/4	1/0	0/1	3/0	0/1

Dado o número reduzido de doentes estudados em cada grupo não foi possível efectuar uma análise estatística. No entanto, os dados sugerem que os doentes com MW *MYD88* L265P apresentam idade ao diagnóstico, contagem de plaquetas e percentagem (%) de CD19 superior aos doentes sem mutação *MYD88* e com uma ligeira predominância de cadeias K. Por outro lado, o doente GMSI IgM com mutação *MYD88* L265P, em comparação com o doente GMSI IgM *MYD88* WT apresenta contagem de plaquetas, níveis de IgM e % CD19 mais baixas. No grupo de doentes com LZM, o doente com mutação *MYD88* L265P apresenta menor idade ao diagnóstico, níveis IgM mais baixos e maior número de leucócitos e % CD19 em comparação com os LZM *MYD88* WT.

Os doentes foram ainda agrupados de acordo com a presença/ausência da mutação *MYD88* L265P independentemente do diagnóstico final (Tabela 8). Para os parâmetros avaliados não se encontraram diferenças estatisticamente significativas, no entanto, os doentes com mutação *MYD88* L265P parecem ter maior número de linfócitos e plaquetas que os doentes *MYD88* WT.

**Tabela 10. Características clínico-laboratoriais de acordo com o estado mutacional do *MYD88*.**

	<b><i>MYD88</i> WT (n=8)</b>	<b><i>MYD88</i> L265P (n=15)</b>	<b><i>p</i> (valor)</b>
<b>Idade (anos)</b>	74 (55-82)	74 (67-85)	0,97
<b>Sexo (F/M)</b>	4/4	2/13	na
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,2 (10,7-16,2)	13,3 (9,5-16,6)	0,82
<b>Linfócitos (10<sup>9</sup>/L)</b>	3,9 (0,8-11,6)	5,2 (1,3-24,1)	0,64
<b>Plaquetas (10<sup>9</sup>/L)</b>	153 (66-218)	206 (66-341)	0,15
<b>IgM (g/L)</b>	11,6 (0,32-60,9)	11,8 (0,17-32,5)	0,97
<b>% células B clonais</b>	19 (1-87)	23 (1-58)	0,69
<b>Cadeias K/λ</b>	6/2	9/6	na

*MYD88* WT – sem mutação

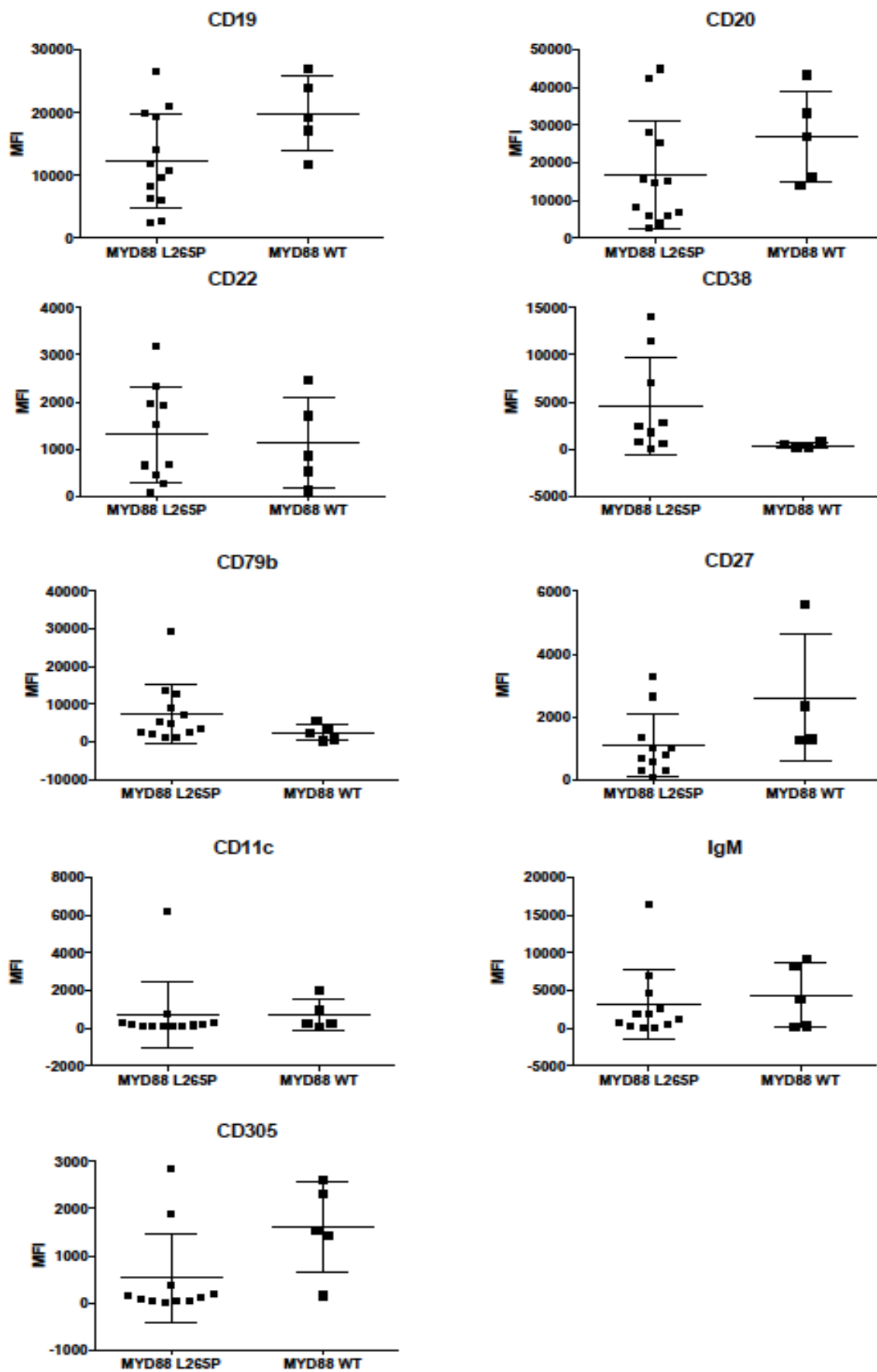
*MYD88* L265P- com mutação

### 4.3 Imunofenótipo e presença de mutação *MYD88* L265P

A imunofenotipagem por citometria de fluxo tem demonstrado ser de grande valor para o diagnóstico diferencial de neoplasias linfoproliferativas das células B, sendo também importante para o prognóstico de doentes com GMSI IgM e MM. A sua utilização em WM foi altamente recomendada no “International Workshop on Waldenstrom Macroglobulinemia de 2003”, no entanto, não existe consenso sobre as características imunofenotípicas do clone de MW (15).

Neste estudo foi re-avaliado, para cada doente, o imunofenótipo por citometria de fluxo através da média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada anticorpo monoclonal que integra o painel *Euroflow*.

Os doentes classificados como MW, GMSI IgM e LLP foram separados em 2 grupos, de acordo com o estado mutacional do *MYD88* de modo a avaliar se existem diferenças entre as MIF e o imunofenótipo *MYD88* L265P (n=13; *MYD88* WT n=5). Apesar de não se observarem diferenças estatisticamente significativas, observou-se que o grupo de doentes com *MYD88* L265P apresenta MIF tendencialmente aumentada para o CD38 e CD79b com diminuição de expressão de CD19, CD20, CD22, CD305 e CD11c em relação aos doentes *MYD88* WT Figura (4).



**Figura 4-** Avaliação da média de intensidade de fluorescência para cada monoclonal do painel EuroFlow, tendo em conta o diagnóstico e a mutação *MYD88* L265P.

Foi ainda calculado o rácio da média de intensidade de fluorescência (MIF) entre os linfócitos B patológicos e os linfócitos B normais (LBp/LBn) para os doentes classificados como MW, GMSI IgM e LLP com e sem mutação *MYD88* L265P, Tabela 8.

**Tabela 11. Avaliação do imunofenótipo através dos rácios (/linfócitos B patológicos/ linfócitos B normais) calculados para os doentes classificados como MW, GMSI IgM e LLP com mutação *MYD88* L265P e sem mutação *MYD88* WT.**

	<i>MYD88</i> L265P (n=14)	<i>MYD88</i> WT (n=5)	p (valor)
CD19	<b>1.28±0.33</b>	<b>1.07±0.51</b>	<b>ss</b>
CD20	<b>1.02±0.46</b>	<b>1.20±0.54</b>	<b>ss</b>
CD38	<b>1.08±0.57</b>	<b>0.37±0.21</b>	<b>0.005</b>
CD23	<b>1.04±0.18</b>	<b>0.87±0.79</b>	<b>0.05</b>
CD10	0.93±0.22	1.26±0.85	ss
CD79b	<b>2.13±3.96</b>	<b>1.03±0.55</b>	<b>0.05</b>
CD200	2.27±4.32	1.19±1.22	ss
CD43	2.51±3.93	2.40±4.70	ss
CD31	1.29±0.73	1.43±0.55	ss
CD305	<b>4.77±6.60</b>	<b>10.76±4.47</b>	<b>ss</b>
CD11c	<b>2.19±2.31</b>	<b>2.98±0.46</b>	<b>ss</b>
IgM	<b>4.42±11.58</b>	<b>14.24±16.23</b>	<b>ss</b>
CD81	0.98±0.13	0.87±0.38	ss
CD103	0.99±1.35	1.00±0.26	ss
CD95	5.85±16.37	0.90±6.28	ss
CD22	<b>0.93±0.83</b>	<b>1.37±1.43</b>	<b>ss</b>
CD185	1.91±3.46	0.92±1.03	ss
CD49d	1.0±0.62	1.28±0.15	ss
CD62L	1.06±0.21	1.10±0.32	ss
CD39	1.47±1.06	1.44±1.18	ss
HLADR	1.25±0.79	1.03±0.15	ss
CD27	<b>0.95±0.14</b>	<b>3.86±3.54</b>	<b>0.006</b>
CD45	1.45±1.29	1.09±0.34	ss



Da avaliação do imunofenótipo através dos rácios (linfócitos B patológicos/linfócitos B normais, foi possível observar que se verificaram diferenças estatisticamente significativas para 4 anticorpos monoclonais (CD38, CD23, CD79b e CD27). Observou-se também em relação aos marcadores de linha B (CD19/CD20/CD22 e CD79b) uma tendência para o rácio de CD22 ser mais diminuído e o rácio de CD79b mais elevado quando comparados entre si, no grupo *MYD88 L265P*. Dos restantes marcadores poderemos destacar rácio para o CD38 como sendo o rácio mais diminuído para o grupo *MYD88 WT* e por sua vez os rácios de CD305 e IgM como os mais elevados para o mesmo grupo.

## 5. Discussão

A Macroglobulinemia de Waldenström é um linfoma de células B raro que se caracteriza pela acumulação descontrolada de células malignas linfoplasmocíticas, principalmente na medula óssea, com produção de imunoglobulinas do tipo IgM monoclonais.

Relativamente à patogénese molecular, há mais de uma década que se reconhece um papel central do factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) na activação da tumorigénese da MW (19). Recentemente, a sequenciação do genoma de doentes com MW veio revolucionar a compreensão da biologia desta doença com a identificação de mutações somáticas recorrentes, nomeadamente a mutação L265P no gene *MYD88* (2). Estudos recentes demonstraram a presença desta mutação em 80-100% das MW, 50-80% das GMSI IgM e em apenas 3-9% dos doentes com LZM, MM e LLC (19), pelo que a identificação da mutação *MYD88* L265P poderá ser útil como marcador diferencial com outras patologias com componente IgM. Estudos *in vitro* comprovaram que a mutação *MYD88* L265P confere ganho de função e promove a sobrevivência e crescimento celular na MW (14).

Neste trabalho foram incluídos 23 doentes, 15 com Macroglobulinemia de Waldenström, 4 com Linfoma da Zona Marginal, 2 com Gamapatia Monoclonal de Significado Indeterminado IgM e 2 com Linfoma Linfoplasmocítico. Os doentes com MW eram maioritariamente do sexo masculino (81,2%) e apresentavam níveis médios de IgM mais elevados, quando comparados com os outros grupos, tal como esperado. Em todos os doentes foi pesquisada a mutação *MYD88* L265P pela metodologia de PCR alelo-específico (ASO-PCR), de acordo com o procedimento descrito por Xu *et al.* (2013). Esta metodologia tem uma sensibilidade estimada para detectar a mutação *MYD88* L265P de 0,1%, razão pela qual foram efectuados estudos em amostras de DNA obtidas de sangue periférico e medula óssea sem separação celular prévia de células CD19.

No grupo de doentes em estudo, a mutação *MYD88* L265P foi detectada em 13/15 (86,7%) das MW, 1/2 GMSI IgM, 1/4 dos LZM e 0/2 dos LLP.

A mutação *MYD88* L265P foi mais prevalente nos doentes com MW, numa percentagem semelhante à descrita na literatura, entre os 71% e 90% (22)(19). Um doente com GMSI IgM também apresentava mutação *MYD88* L265P. No grupo dos LZM a prevalência da mutação foi um pouco superior ao descrito por Varettoni *et al.* (2013), o que pode ser justificado pelo reduzido número de amostras estudadas. A metodologia de ASO-PCR permitiu detectar a mutação *MYD88* L265P num doente (MW) com apenas 0,8% de CD19 monoclonais na MO, comprovando a elevada sensibilidade da técnica.

Em cada grupo de doentes de acordo com o estado mutacional do *MYD88* foram comparadas as características clínico-laboratoriais. Nos parâmetros avaliados: idade, hemoglobina, linfócitos, plaquetas, IgM séria e % de células B clonais, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os doentes com e sem mutação *MYD88* L265P. Adicionalmente, independentemente do diagnóstico, os doentes foram agrupados tendo em conta a mutação *MYD88* L265P, não se encontrando diferenças estatisticamente significativas. Há que ter em conta que a amostra estudada é pequena, no entanto, Jimenez *et al.* (2013), num estudo com 148 doentes (128 *MYD88* L265P e 20 *MYD88* WT), não encontraram diferenças consistentes nestas características clínicas e biológicas em correlação com o estado mutacional do *MYD88*. Contrariamente, Xu *et al.* (2014) observaram que os doentes com MW *MYD88* L265P apresentavam maior envolvimento da MO e níveis séricos de IgM mais elevados do que os doentes com MW *MYD88* WT. Embora a WM seja uma neoplasia linfoproliferativa secretora de IgM, não existe um nível de IgM sérica mínimo, nem uma percentagem mínima de infiltração da medula óssea para estabelecer um diagnóstico e há grande heterogeneidade entre os doentes quanto a estas características biológicas (29). Dos doentes estudados, 14/ 15 MW apresentavam níveis de IgM aumentados, assim como 2/4 LZM, não existindo aumento de IgM no grupo dos Linfomas Linfoplasmocíticos. A concentração da paraproteína IgM tem sido relatada como um factor prognóstico para a progressão em diferentes

estudos, sendo o significado prognóstico dos níveis de hemoglobina, linfocitose, e nível sérico de albumina mais controverso (22).

Atualmente não existe consenso sobre o Imunofenótipo do clone de MW (15). No entanto a citometria de fluxo tem-se demonstrado particularmente útil distinguir patologias linfoproliferativas B de WM, bem como de discrasias de células plasmáticas IgM tais como GMSI IgM e mieloma múltiplo IgM com base no imunofenótipo específico das células plasmáticas(38).

O imunofótipo mais frequentemente encontrado em casos de MW está descrito como apresentando CD19<sup>+</sup>/CD22<sup>low</sup>/CD23<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD27<sup>+</sup> e IgM de superfície (38). O imunofenótipo das MW sugere que a célula B se encontra num estadio avançado de diferenciação e que, provavelmente, deriva de células B de memória IgM que sofre uma mutação somática, mas não isotípica (14). Jimenez *et al.* (2013), encontraram algumas diferenças imunofenotípicas *minor* entre doentes com e sem mutação MYD88 L265P, nomeadamente na expressão de FMC7, mais frequente na ausência da mutação, sendo a expressão de CD23 mais frequente nas MW MYD88 L265P (4). Observaram ainda que doentes com MW e mutação MYD88 L265P apresentam um padrão de expressão de CD27 heterogéneo ao contrário dos negativos para a mutação, que são normalmente positivos ou fortemente positivos para CD27 (4). Também Jelinak *et al* (2017) descrevem um padrão heterogéneo para CD27 e CD38. Apontam ainda que o CD79b será sobre expresso em doentes com MW e que CD305 por sua vez sofrerá up-regulation nos doentes com LZM, sendo segundo estes autores o melhor indicador nos casos de doentes com MW para conseguir fazer a discriminação da patologia.

. Neste estudo foi re-avaliado, para cada doente, o imunofenótipo por citometria de fluxo através da média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada anticorpo monoclonal que integra o painel *Euroflow*, de modo a verificar se existem diferenças de MFI para os doentes com e sem mutação MYD88. Para

todas as amostras estudadas foi encontrado um imunofenótipo de célula B madura, conforme descrito na literatura (4).

No grupo de doentes estudado, não se encontraram neste trabalho diferenças estatisticamente significativas para as MIF dos anticorpos tendo em conta a presença/ausência de mutação *MYD88* L265P. No entanto foi possível observar que o grupo de doentes com *MYD88* L265P apresenta uma media de fluorêscencia tendencialmente aumentada para CD79b, com diminuição de expressão para CD19/CD20 e em particular de CD22, dados corroborados pela literatura (7)(15). No grupo *MYD88* WT verifica-se uma tendência de aumento para o CD305 e IgM de superfície, facto já observado noutros estudos (38).

Esta tendência é parcialmente refletida quando são avaliados os rácios entre os linfócitos B patológicos e o linfócitos B normais.

Da avaliação do imunofenótipo através dos rácios (linfócitos B patológicos/linfócitos B normais),verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para 4 anticorpos monoclonais (CD38, CD23, CD79b e CD27). Observou-se em relação aos marcadores de linha B (CD19/CD20/CD22 e CD79b) uma tendência para o rácio de CD22 ( $0.93\pm0.83$ ) ser o mais diminuído, e o rácio de CD79b ( $2.13\pm3.96$ ) mais elevado no grupo *MYD88* L265, tendência já observada na avaliação da média de fluorescência. . O CD79b faz parte do complexo receptor da célula B (BCR), sendo necessário para a expressão e função deste mesmo receptor, e funciona como um marcador de identificação de linha B. A sua sobre expressão foi considerada por *Jelinek et al.* (2017) como um achado comum nas MW. No mesmo estudo é verificada a sub expressão de CD22 proteína transmembranar que regula a sinalização da célula B induzindo proliferação ou apoptose, observações que corroboram os resultados obtidos neste trabalho. O CD27 é um receptor da superfamilia de factores de necrose tumoral (TNF), sendo um marcador pós centro germinal, positivo em células de memória (39) . Tem-se verificado que o seu padrão não é homogéneo podendo a sua expressão variar (38). Neste estudo, este anticorpo apresenta expressão elevada no grupo de doentes com MW *MYD88* WT. Também Jimenez *et al.*(2013) demonstrou que para o grupo de doentes com *MYD88* WT o CD27 era fortemente expresso.

Quanto ao CD23, receptor de baixa afinidade para Ig E apresenta um rácio baixo ( $1.08 \pm 0.57$ ; CD23:  $0.87 \pm 0.79$ ) para o grupo L265P e WT, respectivamente sendo que na literatura se encontra descrito a down regulation desta proteína em células B patológica com envolvimento linfoplasmocitário (15). Dos restantes marcadores poderemos destacar rácio para o CD38 ( $0.37 \pm 0.21$ ) como sendo o rácio mais diminuído para o grupo *MYD88 WT* e por sua vez os rácios de CD305 ( $10.76 \pm 4.47$ ) e IgM ( $14.24 \pm 16.23$ ) como os mais elevados. O CD38, glicoproteína de membrana presente em células imaturas ou comprometidas a uma linha, também se encontra baixo, o que se justifica segundo a literatura, pois os linfócitos B em estudo neste trabalho são células maduras e não estão a ser aqui avaliadas as células plasmáticas (15).

O rácio para CD305 ou LAIR1 (receptor-1 de imunoglobulina associada a leucócitos) com função de mediar sinalização inibidora da células B, está aumentado ( $10.76 \pm 4.47$ ) para o grupo *MYD 88 WT*, estando descrita na literature para doentes sem mutação (38). Em relação aos rácios IgM que são elevados para ambos os grupos ( $4.42 \pm 11.58$ ;  $14.24 \pm 16.23$ ), a sua sobre expressão também está descrita para doentes com e sem mutação nas patologias aqui estudadas, facto que justifica o overlap destas neoplasias que cursam com aumento de IgM, não sendo assim possível utilizá-lo com parâmetro para diagnóstico diferencial(6).

## Conclusão

Neste trabalho foi efectuada a pesquisa da mutação *MYD88* L265P em 23 doentes com suspeita diagnóstica de LLP.

A mutação *MYD88* L265P foi mais prevalente nos doentes com MW, tendo sido detectada em 86,7% das MW, 50% GMSI IgM, 25% dos LZM e 0% dos LLP, o que está de acordo com os dados da literatura à excepção do LZM (22)(19).

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a presença da mutação *MYD88* L265P, parâmetros laboratoriais e características imunofenotípicas para o painel de anticorpos monoclonais utilizado. No entanto foram encontradas por citometria de fluxo na avaliação das médias de intensidade de fluorescência, algumas tendências, nomeadamente um aumento para CD38 e CD79b e diminuição de CD19, CD20, CD22, CD305 e CD11c no grupo *MYD88* L265P. Foram também encontradas diferenças estaticamente significativas para o rácio das médias de fluorescência entre linfócitos B patológicos e linfócitos B normais nos seguintes marcadores CD79b, CD38, CD27 e CD23 nos doentes com e sem mutação *MYD88* L265P.

O diagnóstico diferencial da MW com outros linfomas B de pequenas células, de MM ou de outras patologias linfoproliferativas B de células maduras, baseado nas características patológicas e fenotípicas, é por vezes difícil e laborioso. Este facto deve-se à frequente sobreposição destas características e à variedade de linfócitos maduros com vários graus de diferenciação plasmática que estas patologias podem apresentar (3). Neste contexto, dada a elevada associação entre a mutação *MYD88* L265P e a MW, a incorporação deste marcador genético nos algoritmos de diagnóstico é uma mais-valia na discriminação da MW de outras neoplasias com características semelhantes.

## Bibliografía

1. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;470(7332):115–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09671>
2. Castillo JJ, Ghobrial IM, Treon SP. Non-Hodgkin lymphoma. 2013; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5851-7>
3. Naderi N, Yang DT. Lymphoplasmacytic lymphoma and waldenstrom macroglobulinemia. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(April):580–5.
4. Jiménez C, Sebastián E, Chillón MC, Giraldo P, Mariano Hernández J, Escalante F, et al. MYD88 L265P is a marker highly characteristic of, but not restricted to, Waldenström's macroglobulinemia. *Leukemia* [Internet]. 2013;27(February):1722–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23446312>
5. Dreyling M, Thieblemont C, Gallamini a, Arcaini L, Campo E, Hermine O, et al. ESMO Consensus conferences: guidelines on malignant lymphoma. part 2: marginal zone lymphoma, mantle cell lymphoma, peripheral T-cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2013 Apr;24(4):857–77.
6. Shaheen SP, Talwalkar SS, Lin P, Medeiros LJ. Waldenstrom Macroglobulinemia : A Review of the Entity and Its Differential Diagnosis. 2012;19(1):11–27.
7. Paiva B, Corchete L a, Vidriales M-B, García-Sanz R, Perez JJ, Aires-Mejia I, et al. The cellular origin and malignant transformation of Waldenström's macroglobulinemia. *Blood* [Internet]. 2015 Feb 5 [cited 2015 Feb 9]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25655603>
8. Dimopoulos MA, Panayiotidis P, Mouloupoulos LA, Sfikakis P, Dalakas M. Waldenström's macroglobulinemia: clinical features, complications, and management. *J Clin Oncol* [Internet]. 2000;18:214–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623712>
9. Cao X, Ye Q, Orlowski RZ, Wang X, Loghavi S, Tu M, et al. Waldenström macroglobulinemia with extramedullary involvement at initial diagnosis portends a poorer prognosis. *J Hematol Oncol* [Internet]. *Journal of Hematology & Oncology*; 2015;8:74. Available from: <http://www.jhoonline.org/content/8/1/74>
10. Sahin I, Leblebjian H, Treon S, Ghobrial I. Waldenstrom macroglobulinemia: From biology to treatment. *Expert Rev Hematol* [Internet]. 2014;7:157–68.



Available from:

<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&N EWS=N&AN=2014092204>

11. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med*. 2012;367:826–33.
12. Swerdlow SH, Kuzu I, Dogan A, Dirnhofer S, Chan JKC, Sander B, et al. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch [Internet]*. Virchows Archiv; 2015; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00428-015-1858-9>
13. Oza a, Rajkumar S V. Waldenstrom macroglobulinemia: prognosis and management. *Blood Cancer J [Internet]*. Nature Publishing Group; 2015;5(03):e296. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bcj.2015.28>
14. Kapoor P, Paludo J, Vallumsetla N, Greipp PR. Waldenström macroglobulinemia: What a hematologist needs to know. *Blood Rev [Internet]*. Elsevier Ltd; 2015;29(5):301–19. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268960X1500017X>
15. Paiva B, Montes MC, García-Sanz R, Ocio EM, Alonso J, de Las Heras N, et al. Multiparameter flow cytometry for the identification of the Waldenström's clone in IgM-MGUS and Waldenström's Macroglobulinemia: new criteria for differential diagnosis and risk stratification. *Leukemia [Internet]*. 2014;28(April 2013):166–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23604227>
16. Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, Fonseca R, Greipp PR, McMaster ML, et al. Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia. *Semin Oncol*. 2003;30(2):110–5.
17. Konoplev S, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE, Jorgensen JL, Lin P. Immunophenotypic profile of lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenstr??m macroglobulinemia. *Am J Clin Pathol*. 2005;124:414–20.
18. Van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012;26(February):1908–75.
19. Landgren O, Tager N. MYD88 and beyond: novel opportunities for diagnosis, prognosis and treatment in Waldenström's Macroglobulinemia.

- Leukemia [Internet]. 2014;(February):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573383>
20. Treon SP, Hunter ZR. A new era for Waldenstrom macroglobulinemia: MYD88 L265P. *Blood*. 2013;121(22):4434–6.
  21. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 1997;278:1612–5.
  22. Varettoni M, Arcaini L, Zibellini S, Boveri E, Rattotti S, Riboni R, et al. Prevalence and clinical significance of the MYD88 ( L265P ) somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia and related mutation in Waldenström lymphoid neoplasms. 2013;121(13):2522–8.
  23. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yokoyama Y, Chiba S. Disease-specific mutations in mature lymphoid neoplasms: Recent advances. *Cancer Sci*. 2014;105(6):623–9.
  24. Ondrejka SL, Lin JJ, Warden DW, Durkin L, Cook JR, Hsi ED. MYD88 L265P somatic mutation: Its usefulness in the differential diagnosis of bone marrow involvement by B-cell lymphoproliferative disorders. *American Journal of Clinical Pathology*. 2013. p. 387–94.
  25. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 1997;7:837–47.
  26. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–7.
  27. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity* [Internet]. 1999;11:115–22. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761300800862>
  28. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL- 18-mediated function. *Immunity*. 1998;9:143–50.
  29. Mori N, Ohwashi M, Yoshinaga K, Mitsuhashi K, Tanaka N, Teramura M, et al. L265P mutation of the MYD88 gene is frequent in Waldenström's macroglobulinemia and its absence in myeloma. *PLoS One*. 2013;8(11).
  30. Treon SP, Xu L, Yang G, Zhou Y, Liu X, Cao Y, et al. MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine*. 2012. p. 826–33.

31. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Cao Y, Liu X, Manning R, et al. Detection of MYD88 L265P in peripheral blood of patients with Waldenström's Macroglobulinemia and IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* [Internet]. 2014;28(February):1698–704. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24509637>
32. Xu L, Hunter ZR, Yang G, Zhou Y, Cao Y, Liu X, et al. MYD88 L265P in Waldenstrom macroglobulinemia, immunoglobulin M monoclonal gammopathy, and other B-cell lymphoproliferative disorders using conventional and quantitative allele-specific polymerase chain reaction. *Blood*. 2013;121(11):2051–8.
33. Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia: 2015 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2015 May;90(4):346–54.
34. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*. 2014;123(18):2791–6.
35. Treon SP, Tripsas CK, Meid K, Warren D, Varma G, Green R, et al. Ibrutinib in Previously Treated Waldenström's Macroglobulinemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2015;372:1430–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25839845>
36. Treon SP, Cao Y, Xu L, Yang G, Liu X, Hunter ZR. Somatic mutations in MYD88 and CXCR4 are determinants of clinical presentation and overall survival in Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2014;123:2791–6.
37. Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* [Internet]. 2012;26(February):1986–2010. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/leu.2012.122>
38. Jelinek T, Bezdekova R, Zatopkova M, Burgos L, Simicek M, Sevcikova T, et al. Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders. *Blood Cancer J* [Internet]. 2017;7(August):e617. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/bcj.2017.90>
39. Johansson U, Bloxham D, Couzens S, Jesson J, Morilla R, Erber W, et al. Guidelines on the use of multicolour flow cytometry in the diagnosis of haematological neoplasms. *Br J Haematol*. 2014 May;165(4):455–88.

